

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-009380  
(43)Date of publication of application : 18.01.1994

---

(51)Int.Cl. A61K 31/155  
A61K 31/155

---

(21)Application number : 05-038572 (71)Applicant : WASHINGTON UNIV  
(22)Date of filing : 26.02.1993 (72)Inventor : WILLIAMSON JOSEPH R  
CORBETT JOHN A  
MCDANIEL MICHAEL L  
TILTON RONALD G

---

(30)Priority  
Priority number : 92 843387 Priority date : 28.02.1992 Priority country : US

---

### (54) INHIBITION OF NITROGEN MONOXIDE FORMATION

#### (57)Abstract:

PURPOSE: To inhibit the nitrogen monoxide formation in warm-blooded mammals by administering hem with a specific amount of methylguanidine or dimethylguanidine.

CONSTITUTION: A warm-blooded mammal is orally administered with methylguanidine or dimethylguanidine at an effective amount enough to inhibit nitrogen monoxide formation therein (1mg/adult/d/kg b.w.) in the form of e.g. capsules or tablets, or parenterally administered therewith through intravenous or subcutaneous injection, thus inhibiting the nitrogen monoxide formation in the mammal without hampering the glucose-induced formation of the high-order glycation final product.

---

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 12.01.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] How to check generation of a nitrogen monoxide in a homeothermic mammal including medicating a homeothermic mammal with methylguanidine or dimethyl guanidine of a nitrogen-monoxide inhibition effective dose.

[Claim 2] A method according to claim 1 by which said mammalian is medicated with said methylguanidine or dimethyl guanidine the inside of a vein, or hypodermically.

[Claim 3] A method according to claim 1 with which mammalian is medicated with a dose which checks generation of a nitrogen monoxide, without said methylguanidine or dimethyl guanidine barring substantially generation of a high order GURIKESHON end product by which glucose induction was carried out.

[Claim 4] A method according to claim 1 by which mammalian is medicated with said methylguanidine.

[Claim 5] A method according to claim 1 by which mammalian is medicated with dimethyl guanidine.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] When this invention is told in detail to the method and pan which check generation of the nitrogen monoxide in a homeothermic mammal, it relates to administration of the methylguanidine as inhibitor of generation of a nitrogen monoxide, or dimethyl guanidine.

[0002]

[Description of the Prior Art] Nitrogen-monoxide synthase carries out the catalyst of the functional oxidation with which L-citrulline and a nitrogen monoxide were mixed from L-arginine (NO., 1, 2). NO. It is thought that it functions as either a signal molecule or an effector molecule according to the isoform of an enzyme. The functional isoform of nitrogen-monoxide synthase is little NO. which makes cGMP which activates guanylate cyclase and, as a result, serves as inner-bark dependence relaxation (2) and a medium of neural transmission (3) generate. It generates. NO. It functions as an effector molecule considered to be generated by the large quantity and to become a medium of a cytotoxin operation of a macrophage from the cytokine of nitrogen-monoxide synthase, and the isoform in which endotoxin induction is possible on a target cell in a macrophage (4). NO. Since it is the powerful vasodilatation nervine and a blood style is made to increase, it is NO. Since both blood style and blood vessel permeability are made to increase, the vasoactive agent (it is (like a histamine and bradykinin)) which stimulates generation is NO. It can become the candidate of data medium of the increment in the blood style induced by diabetes mellitus and the raised glucose and blood vessel permeability (5).

[0003] It was shown that interleukin 1 (IL-1) guides the expression of the isoform in which cytokine induction of the nitrogen-monoxide synthase in Langerhans' islet is possible in recent years. NO. It is proposed that generation can serve as an effector molecule which carries the inhibition effect which IL-1 has on the Langerhans' islet function (6 7). Generation of the nitrogen monoxide by Langerhans' islet is checked using generation of the iron-nitrosyl complex which is barred by the NG-monomethyl-L-arginine (NMMA), which was induced IL-1 and in which EPR detection is possible (8). Moreover, it is known that the cycloheximide which is protein synthesis inhibitor will check generation of the nitrite induced IL-1, are recording of cGMP, and generation of the iron-nitrosyl complex by Langerhans' islet in which EPR detection is possible, therefore it is established that IL-1 guides the isoform in which cytokine induction of the nitrogen-monoxide synthase in Langerhans' islet is possible.

[0004] The cause of a disease of diabetic complications relates to nonenzymatic GURIKESHON of the component besides the imbalance of the metabolic turnover of sorbitol, myo inositol and 1, and 2-diacyl-sn-glycerol, intracellular, and a cell. Aminoguanidine and a nucleophilicity hydrazine compound bar generation of those GURIKESHON products, and the relation with this GURIKESHON is supported by the evidence of mitigating progress of some blood vessels (5 9) by which diabetes-mellitus induction was carried out, a nerve (10), and collagen change (11). Baccarat and others is in vitro NO. by the albumin [ GURIKESHON / albumin ] recently [ (12) ]. It reports that quenching is mitigated by aminoguanidine (it exists when albumin contacts a GURIKESHON agent), and a GURIKESHON product is NO. It proposed that inner-bark dependence relaxation might be spoiled by mitigating activity.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] According to this invention, the new method of checking generation of a nitrogen monoxide in a homeothermic mammal is offered.

[0006]

[Means for Solving the Problem] A method of this invention includes medicating a homeothermic mammal with methylguanidine or dimethyl guanidine of an effective dose, although it is little, and checking generation of a nitrogen monoxide. It is understood that mammalian can be medicated also with a salt which may be permitted pharmacologically, for example, HCl, and a sulfate of these compounds. For now, a cause of a disease of diabetic complications does not yet clarify, and pharmacotherapy with which it was shown that it can be prevented does not yet exist. Although it relates to diabetic severity remarkably since diabetic complications are influenced by blood sugar concentration and hemoglobin [ GURIKETO / hemoglobin ], an effect of an attempt which prevents and/or reverses diabetic complications by efforts to make blood sugar concentration usual is not yet reported.

[0007] A method characterized by medicating a homeothermic mammal with aminoguanidine of an amount which checks generation of a nitrogen monoxide, without raising arterial blood pressure substantially is indicated by the U.S. application 07th under simultaneous continuation for which it applied on December 16, 1991 by these people / No. 807,912. According to this invention, when an intravenous injection was carried out to the usual rat, when arterial

blood pressure increased, as it was proved, it was discovered that methylguanidine is constitutive property and powerful inhibitor of NO generation by which cytokine induction was carried out. However, in contrast with aminoguanidine, methylguanidine is non-validity comparatively in checking a high order GURIKESHON product which is proved with growth of a fluorescence product characteristic of a high order GURIKESHON end product and by which glucose induction was carried out. Therefore, it is clear prevention's by methylguanidine of a blood vessel malfunction induced by diabetes mellitus to attribute to capacity which prevents NO product from generation of a high order GURIKESHON end product.

[0008] This description will become clearer by the following explanation of a suitable example of this invention explained in relation to an attached drawing at the same time it ends by claim which points out especially the theme considered to form this invention, and asserts access clearly. Drawing 1 is a graph which shows change of average arterial blood pressure (MAP) induced by bolus intravenous injection of methylguanidine (MG), aminoguanidine (AG), or an NG-monomethyl-L-arginine (NMMA), change of MAP is recorded by lifting of a pressure higher than the base line by %, and a bolus injection dose is recorded by  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ . Drawing 2 is recorded by % of nitrite generation by which IL-1beta induction of effect by Rin-m5F cell which is the graph which shows effect of methylguanidine (MG) given to nitrite generation carried out, aminoguanidine (AG), or an NG-monomethyl-L-arginine (NMMA) IL-1beta induction, and it has on nitrite generation was done, and concentration of a trial compound is recorded by  $\mu\text{M}$ . Drawing 3 is a graph which shows effect of methylguanidine (MG) given to nitrite generation by Rin-m5F cell of which IL-1beta induction was done, dimethyl guanidine (DMG), and aminoguanidine (AG) like drawing 2. Drawing 4 is a bar graph which shows relative generation of a fluorescence product after incubating methylguanidine, aminoguanidine, or a semicarbazide for six days in glucose-6-phosphate / lysine (G-6-P / lysine).

[0009] Effect of methylguanidine given to the activity of constitutive property (blood vessel) nitrogen-monoxide synthase was evaluated by supervising change of average arterial blood pressure (MAP) after an intravenous injection of methylguanidine in the usual rat of an anesthetic condition. Methylguanidine, aminoguanidine, and a dosage operation of NMMA are shown in drawing 1. Since methylguanidine had L-arginine and antagonism inhibitor of nitrogen-monoxide synthase, i.e., structure similarity powerful to NMMA, these compounds investigated the effect of methylguanidine given to two generation, a nitrite have an equal GUANIJIDO nitrogen radical chemically and according to Rin-m5F cell, and cGMP, of which IL-1beta induction is done, and compared it with the effect of NMMA in the same trial ( drawing 2 ). Moreover, in a similar trial, methylguanidine and its contiguity prototype dimethyl guanidine were compared with effect of aminoguanidine (AG), respectively ( drawing 3 ). Rin-m5F cell lineage is the islet-cell-adenoma cell lineage of a rodent beta cell it is indicated to be that isoform in which cytokinin induction of nitrogen-monoxide synthase is possible is included. Drawing 2 and 3 show a dosage operation of methylguanidine in a product by which IL-1beta induction of a nitrite (oxidation product of a nitrogen monoxide) by Rin-m5F cell which incubated for 18 hours with methylguanidine of concentration five units / ml was IL-1beta\*\* Indicated to be, dimethyl guanidine, aminoguanidine and NMMA, or AG was done, dimethyl guanidine, aminoguanidine and NMMA, or AG. Effect of methylguanidine given to GURIKESHON was evaluated by measuring growth of a fluorescence product after incubation in glucose-6-phosphate / lysine, and compared with an effect that aminoguanidine and a semicarbazide correspond. Although a result is shown in drawing 4, methylguanidine shows what is comparatively been inactive (comparing with aminoguanidine and a semicarbazide) in prevention of a GURIKESHON product by which glucose induction is carried out so that it may be proved with growth of a fluorescence product characteristic of an end product of GURIKESHON.

[0010]

[Example] Although the following detailed examples are indicated in order to explain this invention further, please understand that this invention is not what is limited by the details portion indicated in these specific examples or this description. The result obtained in these examples is shown in tables 1-5 and the attached drawing 1-4. This example explains how to prevent the blood vessel malfunction induced by diabetes mellitus using methylguanidine, and check nitrogen-monoxide synthase.

[0011] a material and a method animal experiment — all the rats used in the trial of these were shut up indoors, and it bred according to the "university committee about protection breeding of a laboratory animal", and the "guideline of NIH about laboratory animal welfare." The rat was put in indoors separately, gave food (feed for standard rats; Ralston Purina of U.S. Indiana Richmond), and water indefinitely, and gave the light of 12-hour \*\* / dark period. : which divided into four groups the Sprague-Dawley rat of the male which was 225-250g weight first — the diabetes mellitus in which diabetes-mellitus; and the group 4 with the unsettled contrast; group 3 in whom the contrast; group 2 with an unsettled group 1 did methylguanidine (mg) processing did mg processing. Diabetes mellitus was induced by carrying out 45mg / weight intravenous injection of 1kg of the streptozotocin (sigma chemical company make of U.S. Missouri St. Louis) using a ketamine anesthetic. The methylguanidine hydrochloride (sigma chemical company make) was administered hypodermically once per day with the dose with a weight [ 25mg / weight ] of 1kg. Furthermore, while giving the water containing the methylguanidine of 1 g/L to the diabetic rat, the water containing the methylguanidine of 2.5 g/L was given to the rat of contrast. The consumption of water was supervised about all rats weekly. Weight was measured weekly, was evaluated three days after streptozotocin administration of the plasma glucose concentration of the morning non-abstaining from food (checking diabetic induction), and, subsequently was evaluated every two weeks after that using the common use glucose oxidase method (14) of Raleigh and PASONO. After four weeks, all the rats were put into the metabolic turnover cage of 24 hour each, and food consumption (g / weight of 100g / 24 hours) and a urine discharge (ml / kidney / 24 hour) were measured. Urinary feed was saved at

-70 degrees C for measurement of a urine albumin discharge (refer to following). After [ of diabetes-mellitus induction ] five weeks, consideration of the following permeability and a blood flow was performed using the rat. [0012] About test-method part blood vessel albumin osmosis, they are two different iodine isotopes.  $^{131}\text{I}$  Reach. The quantum was carried out using the isotope dilution technology based on the injection administration of bovine serum albumin (BSA) which carried out the indicator by  $^{125}\text{I}$  (15-17). It is the marker in which the quantum of the blood vessel albumin filtration is carried out after [ of marker circulation ] 10 minutes using  $^{125}\text{I}$ -BSA, and  $^{131}\text{I}$ -BSA is contained in a blood vessel on the other hand. It acted as a plasma capacity marker for amendment of  $^{125}\text{I}$ -BSA organization activity.

[0013] the iodine isotope method (15) given [ the monomer BSA (20mg) by which preparation purification of the marker by which the radiation indicator was carried out was carried out ] in the above  $^{131}\text{I}$  — or — It iodized by  $^{125}\text{I}$ (product made from NEN RESACHI products of U.S. Massachusetts Boston)1mCi.  $^{57}\text{Co}$ -EDTA was prepared as mentioned above (15 16), the  $^{46}\text{Sc}$ -microsphere (diameter of 10 micrometer) was used, and the following method estimated the part blood style.

[0014] The surgical method rat was anesthetized by INAKUCHIN (FRG, Constance, motorbike gal DIN) (- 100mg / administration in weight the peritoneum of 1kg), \*\*\*\*, the 37-degree C tray for surgery, and the rectal temperature probe were used, and a main temperature was maintained at  $37\pm 0.5$  degrees C. The polyethylene pipe (0.58mm bore) with which the left femoral region vein, the left iliac artery, the right clavicle artery, and the right carotid artery were filled up with the brine (400U heparin / ml) which carried out heparin processing was inserted. Injection administration of the marker was carried out using femoral region vein cannula, and right clavicle arterial cannula was connected to the pressure transducer for the monitor of blood pressure. The left iliac artery was connected to the 1ml syringe attached in the harbor DOMODERU 940 fixed-speed drainage pump prepared beforehand in order to discharge with 0.055ml constant speed for /. The head of the cannula in a right carotid artery was placed into the ventriculus sinister of the heart, and was used for the impregnation of a microsphere by which the radiation indicator was carried out. Intubation was carried out to the trachea and it connected with the artificial respiration equipment for small rodents which helps continuous aeration.

[0015] it sets to the test-method time amount 0 — the intravenous injection of  $^{125}\text{I}$ -albumin (inside of 0.3ml of brine) and  $^{57}\text{Co}$ -EDTA (- in 0.1ml of brine 0.1microcurie) was carried out, and the drainage pump was simultaneously put into operation. After [ of time amount 0 ] 8 minutes, it injected with  $^{131}\text{I}$ -BSA0.2ml, and it injected slowly after 1 minute, having  $^{46}\text{Sc}$ -applied it for - 30 seconds. After 10 minutes, the whole blood liquid flow of the heart was stopped, the drainage pump was suspended simultaneously, and various organizations were extracted for gamma ray spectrometry. The kidney, the bladder, and the ureter were taken out. It was cut open by the method which explained the eye above (15 16), and the organization obtained from both eyes was assembled before gamma ray spectrometry. The weight of all organization samples and artery plasma samples was measured, it measured with the gamma ray spectrometry vessel connected with the Hewlett Packard 1000A computer with an interface, data was amended by said computer to the background, and it was saved for the next analysis.

[0016] It computed by the method (15, 16, 17) which already explained the quantitative index of the analysis  $^{125}\text{I}$ -BSA organization cleaning value of data, and expressed as a part for mug plasma / g organization weight/. It organizes [ inner / be / it ] very simply. Inside of the artery plasma sample obtained by  $^{125}\text{I}$ -BSA activity at the time of test termination By applying the ratio of  $^{125}\text{I}$ -BSA /  $^{131}\text{I}$ -BSA activity,  $^{125}\text{I}$ -BSA organization activity was amended about the marker contained during an organization. Blood vessel — It was amended.  $^{125}\text{I}$ -BSA organization activity was time-average-ized. It divided by  $^{125}\text{I}$ -BSA plasma activity (obtained from the sample with which the plasma obtained from the blowdown syringe was fully mixed), and marker cycle time (for 10 minutes), and, subsequently to per organization weight of 1g, standardized. The filtration velocity (GFR) of mesangium was computed by the already explained method (18). In order to compute a part blood style, it broke by the total activity of  $^{46}\text{Sc}$  in the reference blood sample which was able to acquire the total activity of  $^{46}\text{Sc}$  in a retina from the blowdown syringe, and subsequently, it applied by the pump elimination rate and expressed as a part for ml/g organization weight/(19).

[0017] The high order glycosylation product of the preparation lysine-origin of a high order glycosylation end product was prepared by the method (12) of Baccarat and others by incubating the glucose-6-phosphate and L-lysine of 100mM in the 0.2M sodium phosphate buffer solution and pH7.4. This incubation was performed by having maintained the sterilization condition, was maintained for - six days in the room temperature in the dark place, it used the LS-5B fluorophotometer of Perkin-Elmer then, used the excitation in 370nm, and the radiation in 440nm for it, and measured whenever [ relative fluorescence ] as an index of GURIKESHON. Before spectrophotometric measurement, the sample was diluted with brine to 1:11. The capacity for the methylguanidine of 10 and 100mM concentration, aminoguanidine, or a semicarbazide to check a GURIKESHON process was measured in two separate trials ( drawing 4 ).

[0018] The blood-pressure-measurement taelle-cuff method (20 21) was used, the gap of one week was set and the blood pressure of the contraction stage in a conscious rat was measured. First, the animal was placed into the arresting gear and the method by expanding a sphygmomanometer several times was adopted. Blood pressure was measured also from the iliac artery cannula in the rat of an anesthetic condition between considerations of permeability.

[0019] The Sprague-Dawley rat of the usual male of 300g weight from the effect 250 of pill injection of the methylguanidine given to average arterial blood pressure 100mg / weight 1kg ranks second, and it anesthetizes by

d-tubocurarine chloride with a weight [ 0.1ml / weight ] of 1kg. The polyvinyl pipe (0.8x0.5mm) which filled up the left femoral region blood vessel (marker impregnation sake) and the right iliac artery (the monitor of blood pressure sake) with the brine by which heparin processing was carried out was inserted, and cannula was inserted in the trachea, and in order to help continuous aeration, it connected with the artificial respiration equipment for small rodents. After arterial blood pressure was stabilized, in the separate animal, the intravenous injection of the increasing methylguanidine of an amount (3.1 and 50micromol/kg weight) or the NG-monomethyl-L-arginine (NMMA) was carried out by the capacity of 0.5ml, and the elevation of blood pressure of a peak was recorded using RS3200 recording device of gold. The result was expressed as a percentage of the elevation of blood pressure on the base line.

[0020] Statistical-analysis data was expressed as average\*\*1SD. Analysis of distribution was performed using the general linear-model procedure of SAS. In order to decrease the error potential type 1 relevant to a multiplex comparison, the van DERUBERU DIN test estimated beforehand the difference between [ whole ] the groups to each parameter. When a remarkable difference ( $p < 0.05$ ) was statistically accepted among the groups to the given parameter, the duplex method was compared with the least square method after non-population parameter (order of rank) BURON conversion of all data.

[0021] Example 2 this example is IL-1beta by Rin-m5F cell. – The effect of methylguanidine in the induced nitrite generation is explained ( drawing 2 ). From the University of Washington tissue culture exchange pin center, large, Rin-m5F cell which came to hand was equally divided in ejection and a 1ml Petri dish from the growth flask (55-80x106 a cell/flask) by the trypsin/EDTA treatment, and was put in (per [ condition ] 1 – 2x106 Rin-m5F cell). Incubation of the cell was carried out for 18 hours into 1ml of completeness CMRL-1066 to which a perfect CMRL-1066 tissue-culture radical (the fetal calf serum and the 2mML-glutamine by which heat inactivation was carried out 10%, 50 units / ml penicillin, and 50microg [/ml] streptomycin) or methylguanidine (MG), aminoguanidine (AG), or NMMA was supplied (under 95% air and the ambient atmosphere of 5%CO2). Supernatant liquid was removed after incubation and it measured in 100microl aliquot by the same common use method as the method (8 13) which described the nitrite above. It is the average [ of 4 which expresses as induced nitrite generation (%) and contains 3 times per trial of repeats ] of each trial of \*\*SEM IL-1 about a result. inhibition of the nitrogen-monoxide generation by the isoform which a result can cytokine induce [ of nitrogen-monoxide synthase ] — setting — both AG and NMMA — MG – the 10 times larger thing is shown.

[0022] IL-1beta by example 3 Rin-m5F cell – It examines by the method given [ each effect of methylguanidine / which is given to generation of the induced nitrite /, 1, and 1-dimethyl guanidine, and aminoguanidine ] in an example 2, and the obtained result is shown in drawing 3 . The result shows the large thing in order of AG>DMG>MG about inhibition of the cytokine induction isoform of nitrite synthase.

[0023] The following tables 1-5 and the attached drawings 1-4 record the result obtained in the above-mentioned example. These results show that methylguanidine and dimethyl guanidine are constitutive property and powerful inhibitor of NO generation by which cytokine induction was carried out. This is IL-1beta of the nitrite in the cell adenoma cell of the rodent according to methylguanidine and dimethyl guanidine as shown in lifting of the average arterial blood pressure by the methylguanidine at the time of carrying out an intravenous injection to the usual rat as shown in drawing 1 , and a list drawing 2 and 3. – It is proved by inhibition of the induced increment. In methylguanidine barring the GURIKESHON generation by which glucose induction was carried out (proved by generation of a fluorescence product characteristic of a high order GURIKESHON end product), since it is inactive comparatively ( drawing 4 ) (comparing with aminoguanidine), it is thought that the prevention by the methylguanidine of the blood vessel malfunction of diabetes-mellitus induction is what is attributed to the capacity for it to check NO generation. Therefore, the dimethyl guanidine which is methylguanidine and its contiguity prototype is effective in prevention of the complication of diabetes mellitus besides inflammatory [ accompanied by the increment in generation of NO ], and an immune disease.

[A table 1]

表 1

体重、血漿グルコース及び水消費に与える  
糖尿病及びメチルグアニジンの影響

	対 照		糖尿病	
	対 照	+mg	糖尿病	+mg
ラット数	10	11	14	18
体 重 (g)				
初 期	249±20	256±16	250±19	248±18
2週間後	326±25	300±31	297±23	271±23
4週間後	375±41	351±37	334±45	294±50
血漿グルコース (mg/dL)	130±15	131±28	419±120	420±87
ヘマトクリット(%)	43±2	42±1	42±1	42±2
血 壓 (mm Hg)				
意識あり	125±18	121±7	123±5	126±5
麻酔状態	118±14	114±14	120±16	121±14
水消費 (ml/日)	46±6	32±9	108±42	93±53

[A table 2]

表 2

<sup>125</sup>I-アルブミン浸透<sup>a</sup>に与える糖尿病  
及びメチルケアニジン(mg)の影響

	対 照		糖尿病	
	対 照	+mg	糖尿病	+mg
ラット数	10	8	11	9
目				
前部ブドウ膜	266±77 <sup>b</sup>	359±146	623±109 <sup>a</sup>	370±60 <sup>b</sup>
後部ブドウ膜	328±106	312±101	742±134 <sup>a</sup>	358±108
網膜	47±12	61±11	116±30 <sup>a</sup>	55±18
座骨神経	47±13	47±10	121±22 <sup>a</sup>	50±10
大動脈	62±20	60±18	155±37 <sup>a</sup>	85±41
腎 臓	727±239	714±214	1011±265 <sup>a</sup>	738±169
肺	1805±532	1656±454	1405±324	1498±487
横隔膜	201±75	190±27	210±61	216±46
心 臓	521±135	731±269	534±62	599±68
脳	5±3	4±3	5±2	6±4

<sup>a</sup>  $\mu\text{g}$  血漿/体重 1 g/分: 試験手順の詳細は実施例 1 の方法を参照せよ。

<sup>b</sup> 平均±SD

スチューデントの t 検定により未処理の対照とは著しく異なる。

: <sup>a</sup>p < 0.001; <sup>b</sup>p < 0.05; <sup>c</sup>p < 0.01.

[A table 3]

表 3

## 部位血液流へ与える糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

	前部ブドウ	後部ブドウ				
(n)	膜	膜	網膜	座骨神経	腎臓	
対照	(10)	2.0±0.6	3.4±0.6	0.43±0.02	0.06±0.02	6.5±0.3
対照+mg	(8)	2.4±0.5	3.3±0.6	0.45±0.07	0.07±0.03	4.8±0.3 <sup>a</sup>
糖尿病	(10)	2.7±0.3 <sup>b</sup>	4.2±0.5 <sup>b</sup>	0.57±0.08 <sup>b</sup>	0.09±0.01 <sup>a</sup>	6.0±0.4 <sup>c</sup>
糖尿病+mg	(9)	2.3±0.6	3.9±0.6	0.45±0.04	0.06±0.02	5.8±0.3 <sup>a</sup>

\* ml/分/体重1g; 値は放射線標識されたミクロスフェアを使用して測定した  
平均±1SDである。 (~10 μm 径)

スチューデントのt検定により対照と著しく異なる。: <sup>a</sup>p<0.001;

<sup>b</sup>p<0.005; <sup>c</sup>p<0.01.

[A table 4]

表 4

## GFR\* へ与える糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

	(n)	全腎臓当り	腎臓1g当り
対照	(10)	1.33 ± 0.19	0.85 ± 0.07
対照+mg	(8)	1.53 ± 0.29	0.87 ± 0.08
糖尿病	(10)	1.81 ± 0.25 <sup>b</sup>	0.92 ± 0.14
糖尿病+mg	(9)	1.59 ± 0.15 <sup>b,c</sup>	0.85 ± 0.09

\* ml/分; 値は放射線標識された<sup>57</sup>Co-EDTAを使用して測定  
した平均±1SDである。

スチューデントのt検定により対照と著しく異なる。: <sup>a</sup>p<0.001;

<sup>b</sup>p<0.005

スチューデントのt検定により糖尿病と著しく異なる。: <sup>c</sup>p<0.05.

[A table 5]

表 5

組織ソルビトールとミオイノシトールへ与える  
糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

	対 照		糖尿病	
	対 照	+mg	糖尿病	+mg
ラット数	7	8	11	9
網 膜				
ソルビトール	102±16*	102±31	933±275	533±265
ミオイノシトール	1613±516	1529±187	1564±452	1513±402
座骨神経				
ソルビトール	183±41	194±75	1999±334	1234±710
ミオイノシトール	3943±526	4263±1587	3444±639	3308±792
赤血球				
ソルビトール	6±1	6±2	44±9	40±8
ミオイノシトール	131±47	104±19	109±20	103±19

\* 値は平均±SDである。 ; 試験手順については実施例1の方法を参照  
せよ。

[0024] The methylguanidine and dimethyl guanidine inhibitor of nitrogen-monoxide generation which were explained into this description can be used so that a homeothermic mammal may be medicated as a formula object with the method of common use, the diluent which may be permitted pharmacologically preferably, and support. The amount of the activity inhibitor prescribed for the patient must be an effective dose, i.e., the amount which does not show a toxic effect heavier than the profit accompanying the activity although it is effective in remedy. It is thought that the dose per human being's adult's day is usually the range of about 1mg or more of chemicals per weight of 1K. Although the suitable path of administration is internal use by a capsule, the tablet, syrup, the electricity sill, and the gestalt of the resemblance, parenteral administration like the inside of a vein and the peritoneum or hypodermically can also be used for it. It can raise administering this drug intravenously as an aquosity solution like a physiological saline as an example. The suitable formula object of this drug in the diluent in a therapy administration gestalt object which may be permitted pharmacologically, and support can refer to the common text in the ASAOSORU edit "REMINTONZUFAMASHU Tikal Science" 16 edition of the Mac publishing company of for example, U.S. Pennsylvania Easton, and this technical field as shown in (1980), and can prepare it.

[0025] For this contractor, the example of various others which do not deviate from the pneuma and the range of this invention will become clear, after reading this description. Such all examples mean being included within the limits of the claim in this description.

[0026] The reference quoted in the parenthesis in this description is as follows.

1. 88 D.J. SUCHU yell, H.J. CHO, N.S. won, M.F. UAISU, C.F. Nathan, "Proc.Natl.Acad.Sci.USA", 7773 (1991).
2. S. MONKADA, R.M.J. Palmer, E.A. HIGUSU, "Pharmacol.Reviews", 43,109 (1991).
3. J. girth wait, "Trends Neurol.Sci.", 14:60 (1991).
4. J.B. HIBUSU and Jr. — "Nitric Oxide from L-Arginine:a Bioregulatory System", S. MONKADA and E. HIGUSU, an Eds. ERUZEBI yell, New York, (1990), and pp 189-223.
5. 7 G. PAGURIZE, R.G. chill ton, J.R. Williamson, "Diabetes/Metabolism Reviews", 35 (1991).
6. C. Southern, D. SHARU star, I.C. green, "Febs Lett.276", 42 (1990).
7. J.A. corvette, J.L. won, M.A. SUWITO land, J.R. Lancaster, Jr., and M.L. McDaniel, "Biochemical J." (submitted).
8. J. J.A. corvette, J.R. Lancaster, Jr., and M.A. SUWITO land, M.L. McDaniel, "Biol.Chem.", 266, 21351-21354 (1991).
9. 16 J.R. Williamson et al., "Diabete & Metab.", 3369 (1990). T. 40 Solis-RIPAROTA, M. Cooper, D. PAPAZO glow, B. Clerks, G. JIERAMUSU, "Diabetes", 1328 (1991).
10. M. KIHARA et al., "Proc.Natl.Acad.Sci.USA88", 6107 (1991).

11. 318 N. M. Brown Lee, A. Cerami, H. BURASSARA, "Engl.J.Med.", 1315 (1988). M. 232 Brown Lee, H. BURASSARA, A. KUNI, P. Ulich, A. Cerami, "Science", 1629 (1986).
12. J. R. BUKARA, K.J. Tracy, A. Cerami, "Clin.Invest.", 87,432 (1991).
13. L.C. greens, "Anal.Biochem.126", 131 (1982).
14. O.H. Raleigh, J.V. PASONO (1972) "A Flexible System of Enzymatic Analysis.", Orlando : Academic Press.
15. An R.G. chill ton, K. Chillan, G. PAGURIZE, D.M. IDO, M.A. pro BINSU, W.R. Sherman, C. kilo, J.R. Williamson, "Diabetes 38", 1258-1270 (1989).
16. G. PAGURIZE, an R.G. chill ton, A. speediness, K. Chillan, M.A. pro BINSU, C. kilo, J.R. Williamson, "Metabolism 39", 690-697 (1990).
17. G. PAGURIZE, an R.G. chill ton, K. Chillan, A. speediness, M. pro BINSU, D.M. IDO, P.E. Lacey, C. kilo, J.R. Williamson, "Diabetes 39", 323-332 (1990).
18. Y.Ido, an R.G. chill ton, K. Chillan and J.R. Williamson, "Kidney Int.", In press, 1992.
19. G. PAGURIZE, an R.G. chill ton, A. speediness, E. SANTARERI, D.M. IDO, M.A. pro BINSU, C. kilo, W.R. Sherman, J.R. Williamson, "Diabetes 39", 312-322 (1990).
20. J. M.J. deflection glee, "Lab.Clin.Med.", 62,223-230 (1963).
21. J. J.M. FEFA, M.A. FEFA, E.D. flow RIHHI, "Lab.Clin Med.", 78,957-962 (1971).

[0027] Research of \*\*\*\*\* to assistance of government was done in part by the license DK 06181 of the U.S. National Institute of Health, T32DK07296, and EY06600, HL39934 and DK20579 gaining assistance.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the graph which shows change of the average arterial blood pressure (MAP) induced by the bolus intravenous injection of methylguanidine (MG), aminoguanidine (AG), or an NG-monomethyl-L-arginine (NMMA).

[Drawing 2] It is the graph which shows the effect of the methylguanidine (MG) given to the nitrite generation by Rin-m5F cell of which IL-1beta induction was done, aminoguanidine (AG), or an NG-monomethyl-L-arginine (NMMA).

[Drawing 3] It is the graph which shows the effect of the methylguanidine (MG) given to the nitrite generation by Rin-m5F cell of which IL-1beta induction was done, dimethyl guanidine (DMG), and aminoguanidine (AG) like drawing 2.

[Drawing 4] It is the bar graph which shows the relative generation of a fluorescence product after incubating methylguanidine, aminoguanidine, or a semicarbazide for six days in glucose-6-phosphate / lysine (G-6-P / lysine).

---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-9380

(43)公開日 平成6年(1994)1月18日

(51)Int.CI.<sup>5</sup>  
A61K 31/155

識別記号 AED  
ADP

庁内整理番号 8413-4  
8413-4

E I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数5 (全13頁)

(21)出願番号 特願平5-38572  
(22)出願日 平成5年(1993)2月26日  
(31)優先権主張番号 843387  
(32)優先日 1992年2月28日  
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591003183  
ワシントン ユニバーシティ  
アメリカ合衆国ミズーリ州、セントルイス、ブルッキングス ドライブ ナンバー  
1  
(72)発明者 ジョセフ アール、ウイリアムソン  
アメリカ合衆国ミズーリ州セントルイス、エス、ユークリッド 660、ワシントン ユニバーシティ スクール オブ メド、デブト オブ パソロジイ 気付  
(74)代理人 弁理士 浅村 哲 (外3名)

最終頁に續く

(54)【発明の名称】一酸化窒素生成の阻害方法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】温血哺乳動物における一酸化窒素生成を阻害する方法を提供する。

【構成】一酸化窒素阻害有効量のメチルグアニジンまたはジメチルグアニジンを温血哺乳動物に投与する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 一酸化窒素阻害有効量のメチルグアニジンまたはジメチルグアニジンを温血哺乳動物に投与することを含む温血哺乳動物における一酸化窒素の生成を阻害する方法。

【請求項2】 前記メチルグアニジンまたはジメチルグアニジンが、前記哺乳動物へ静脈内または皮下に投与される請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記メチルグアニジンまたはジメチルグアニジンが、グルコース誘発された、高次グリケーション最終生成物の生成を実質的に妨げることなく一酸化窒素の生成を阻害する投与量により哺乳動物に投与される請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記メチルグアニジンが哺乳動物に投与される請求項1に記載の方法。

【請求項5】 ジメチルグアニジンが哺乳動物に投与される請求項1に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、温血哺乳動物における一酸化窒素の生成を阻害する方法、さらに詳しく言うと、一酸化窒素の生成のインヒビターとしてのメチルグアニジンまたはジメチルグアニジンの投与に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 一酸化窒素シンターゼは、L-アルギニンからL-シトルリン及び一酸化窒素の混合された機能酸化を触媒する (NO<sub>x</sub>、1、2)。NO<sub>x</sub> は、酵素のイソフォームに応じてシグナル分子またはエフェクター分子のいずれかとして機能すると考えられる。一酸化窒素シンターゼの機能的イソフォームは、グアニル酸シクラーゼを活性化しその結果内皮依存弛緩 (2) 及び神経伝達 (3) の媒介となる cGMP を生成させる少量のNO<sub>x</sub> を生成する。NO<sub>x</sub> は、一酸化窒素シンターゼのサイトカイン及び内毒素誘発可能なイソフォームより大量に生成され、大食細胞中では、標的細胞上で大食細胞の細胞毒作用の媒介となると考えられるエフェクター分子として機能する (4)。NO<sub>x</sub> は、強力な血管拡張神経素であり、血液流を増加させるので、そして、NO<sub>x</sub> 生成を刺激する血管作用素 (ヒスタミン及びブラジキニンのような) は、血液流及び血管浸透性の両者を増加させるので、NO<sub>x</sub> は糖尿病及び高められたグルコースにより誘発される血液流及び血管浸透性の増加の媒体の候補者となり得る (5)。

【0003】 近年、インターロイキン-1 (IL-1) が、ランゲルハンス島中の一酸化窒素シンターゼのサイトカイン誘発可能なイソフォームの表現を誘導することが示された。NO<sub>x</sub> の生成は、IL-1 がランゲルハンス島機能に与える阻害影響を媒介するエフェクター分子となり得ることが提案されている (6、7)。N<sup>+</sup>-モノメチル-L-アルギニン (NMMA) により妨げられ

る IL-1 誘発された EPR 検出可能な鉄-ニトロシル複合体の生成を利用して、ランゲルハンス島による一酸化窒素の生成が確認されている (8)。また、タンパク質合成インヒビターであるシクロヘキシミドは、IL-1 誘発される亜硝酸塩の生成、cGMP の蓄積及びランゲルハンス島による EPR 検出可能な鉄-ニトロシル複合体の生成を阻害することが知られており、従って、IL-1 は、ランゲルハンス島内の一酸化窒素シンターゼのサイトカイン誘発可能なイソフォームを誘導することが確立されている。

【0004】 糖尿病合併症の病因は、ソルビトール、ミオイノシトール及び 1、2-ジアシル-sn-グリセロールの代謝の不均衡及び細胞内及び細胞外の成分の非酵素的グリケーションに関連する。このグリケーションとの関連は、アミノグアニジン、求核性ヒドロジン化合物がそれらのグリケーション生成物の生成を妨げ、いくつかの糖尿病誘発された血管 (5、9)、神経 (10) 及びコラーゲン変化 (11) の進展を軽減するという証拠によって支持される。バカララは (12) 最近、グリケーションされたアルブミンによるインビトロの NO<sub>x</sub> のクエンチがアミノグアニジン (アルブミンがグリケーション剤に接触したときに存在する) により軽減されることを報告し、グリケーション生成物が、NO<sub>x</sub> 活性を軽減することにより内皮依存弛緩を損い得ることを提案した。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明によれば、温血哺乳動物において一酸化窒素の生成を阻害する新規な方法が提供される。

## 30 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明の方法は、少量であるが有効量のメチルグアニジンまたはジメチルグアニジンを温血哺乳動物に投与して、一酸化窒素の生成を阻害することを含む。これらの化合物の薬理学的に許容され得る塩、例えば HCl 及び硫酸塩も哺乳動物に投与することができることが理解される。目下のところ、糖尿病合併症の病因は未だはっきりしておらず、それを予防し得ることが示された薬物療法は未だ存在しない。糖尿病合併症は、血糖濃度及びグリケートされたヘモグロビンにより影響されるので糖尿病の重症度に著しく関連するが、血糖濃度を通常にする努力により糖尿病合併症を防止及び/または逆転する試みの効果は、未だ報告されていない。

【0007】 本出願人による 1991 年 12 月 16 日に出願された同時並続中の米国出願第 07/807,912 号には、動脈血圧を実質的に高めずに一酸化窒素の生成を阻害する量のアミノグアニジンを温血哺乳動物に投与することを特徴とする方法が開示されている。本発明によれば、通常のラットに静脈内注射した場合に動脈血圧が増加したことによって証明されたように、メチルグ

アニジンは構造性及びサイトカイン誘発されたNO生成の強力なインヒビターであることが発見された。しかしながら、アミノグアニジンとは対照的に、メチルグアニジンは高次のグリケーション最終生成物に特徴的な蛍光性生成物の成長により証明されるグルコース誘発された高次グリケーション生成物を阻害することにおいて比較的非有効である。従って、糖尿病により誘発された血管機能不全のメチルグアニジンによる予防は、高次グリケーション最終生成物の生成よりもNO生成物を阻害する能力に帰することが明らかである。

【0008】本明細書は、本発明を形成すると考えられる主題を特に指摘し明確に権利を主張する特許請求の範囲で終結すると同時に、添付の図面に関連して説明される本発明の好適具体例の下記の説明によって、より明らかとなるであろう。図1は、メチルグアニジン(MG)、アミノグアニジン(AG)またはN<sup>ε</sup>-モノメチル-L-アルギニン(NMMA)のボーラス静脈内注射により誘発された平均動脈血圧(MAP)の変化を示すグラフであり、MAPの変化は、基底線より高い圧力の上昇により%で記録され、ボーラス注射投与量はμm<sup>0</sup>1/kgで記録されている。図2は、Rin-m5F細胞によるIL-1β誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン(MG)、アミノグアニジン(AG)またはN<sup>ε</sup>-モノメチル-L-アルギニン(NMMA)の影響を示すグラフであり、亜硝酸塩生成に与える影響は、IL-1β誘発された亜硝酸塩生成の%で記録され、試験化合物の濃度はμMで記録されている。図3は、図2と同様に、Rin-m5F細胞によるIL-1β誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン(MG)、ジメチルグアニジン(DMG)及びアミノグアニジン(AG)の影響を示すグラフである。図4は、グルコース-6-ホスフェート/リシン(G-6-P/リシン)中で6日間、メチルグアニジン、アミノグアニジンまたはセミカルバジドをインキュベートした後の、蛍光性生成物の相対的生成を示す棒グラフである。

【0009】構造性(血管の)一酸化窒素シンターゼの活性に与えるメチルグアニジンの影響は、麻酔状態の通常のラットにおけるメチルグアニジンの静脈内注射後の平均動脈血圧(MAP)の変化を監視することによって評価した。メチルグアニジン、アミノグアニジン及びNMMAの用量作用を図1に示す。メチルグアニジンは、L-アルギニン及び一酸化窒素シンターゼの拮抗インヒビター、即ちNMMAに強力な構造類似性を有しているので、これらの化合物は、2つの化学的に均等なグアニジド窒素基を有しており、Rin-m5F細胞による亜硝酸塩及びcGMPのIL-1β誘発される生成に与えるメチルグアニジンの影響を調べて、同様の試験におけるNMMAの効果と比較した(図2)。また類似の試験において、メチルグアニジン及びその近接類似物ジメチルグアニジンをそれぞれアミノグアニジン(AG)の影

響と比較した(図3)。Rin-m5F細胞系は、一酸化窒素シンターゼのサイトカイニン誘発可能なイソフォームを含むことが示されている齧歯動物β細胞のランゲルハンス島細胞腫瘍細胞系である。図2及び3は、5ユニット/mlのIL-1β示された濃度のメチルグアニジン、ジメチルグアニジン、アミノグアニジン及びNMMAまたはAGとともに18時間インキュベートしたRin-m5F細胞による亜硝酸塩(一酸化窒素の酸化生成物)のIL-1β誘発された生成物における、メチルグアニジン、ジメチルグアニジン、アミノグアニジン及びNMMAまたはAGの用量作用を示す。グリケーションに与えるメチルグアニジンの影響は、グルコース-6-ホスフェート/リシン中におけるインキュベート後の蛍光性生成物の成長を測定することによって評価され、アミノグアニジン及びセミカルバジドの相当する効果と比較した。結果を図4に示すが、グリケーションの最終生成物に特徴的な蛍光性生成物の成長によって証明されるように、メチルグアニジンは、グルコース誘発されるグリケーション生成物の防止において比較的不活性である(アミノグアニジン及びセミカルバジドと比較して)ことを示している。

## 【0010】

【実施例】本発明をさらに説明するために、以下の詳細な実施例を開示するが、本発明は、これらの特定の実施例または本明細書中に記載される詳細部分によって限定されるものではないことを理解されたい。これらの実施例において得られた結果を表1～5及び添付の図面1～4中に示す。この実施例は、メチルグアニジンを使用して糖尿病により誘発される血管機能不全を予防して一酸化窒素シンターゼを阻害する方法を説明するものである。

## 【0011】材料及び方法

## 動物実験

これらの試験において使用した全てのラットを屋内に閉じ込め、「実験動物の愛護飼育に関する大学委員会」及び「実験動物福祉に関するNIHのガイドライン」に従って飼育した。ラットは別個に屋内に入れ、無制限に食糧(標準ラット用飼料:米国インディアナ州リッチモンドのラルストンピュリナ)及び水を与え、12時間明/暗周期の光を与えた。最初に225～250g重量であった雄のSprague-Dawleyラットを4つのグループに分けた:グループ1は、未処理の対照;グループ2は、メチルグアニジン(mg)処理した対照;グループ3は、未処理の糖尿病;及びグループ4は、mg処理した糖尿病。糖尿病は、ケタミン麻酔薬を使用してストレプトゾトシン(米国ミズーリ州セントルイスのシグマケミカル社製)を45mg/体重1kg静脈内注射することにより誘発した。メチルグアニジン塩酸塩(シグマケミカル社製)を25mg/体重1kgの投与量で50 1日1回皮下投与した。さらに、糖尿病のラットには1

g/Lのメチルグアニジンを含む水を与える一方、対照のラットには2.5 g/Lのメチルグアニジンを含む水を与えた。水の消費量は全てのラットに関して1週間毎に監視した。体重は一週間毎に測定し、非絶食の朝の血漿グルコース濃度をストレアトゾトシン投与の3日後に評価して(糖尿病の誘発を確認し)、次いでその後2週間毎に、ローリーとパゾーの慣用グルコースオキシダーゼ方法(14)を使用して評価した。4週間後に、全てのラットを24時間個々の代謝ケージに入れ、食糧消費(g/体重100g/24時間)及び尿排出量(mL/腎臓/24時間)を測定した。尿の飼料を尿アルブミン排出量の測定のために-70°Cで保存した(下記参照)。糖尿病誘発の5週間後に、ラットを使用して下記の浸透性及び血流の考察を行った。

#### 【0012】試験方法

部位血管アルブミン浸透を、2つの異なるヨウ素同位元素<sup>131</sup>I及び<sup>131</sup>Iにより標識したウシ血清アルブミン(BSA)の注射投与に基づく同位元素希釈技術を使用して定量した(15~17)。<sup>131</sup>I-BSAを使用してトレーサー循環の10分後に血管アルブミン通過を定量し、一方、<sup>131</sup>I-BSAは血管内に含まれるトレーサーの<sup>131</sup>I-BSA組織活性の補正のための血漿容量マーカーとして作用した。

#### 【0013】放射線標識されたトレーサーの調製

精製されたモノマーBSA(20mg)を上記に記載のヨウ素同位元素方法(15)により<sup>131</sup>Iまたは<sup>131</sup>I(米国マサチューセッツ州ボストンのNENレサーチアロダクト製)1mCiによりヨウ化した。<sup>131</sup>Co-EDTAを上記のようにして調製し(15, 16)、<sup>131</sup>Sc-ミクロスフェア(10μm径)を使用して、下記の方法で部位血液流を評価した。

#### 【0014】外科的方法

ラットをイナクチン(FRG、コンスタンツ、バイクガルテン)により麻酔し(~100mg/体重1kg腹膜内投与)、熱灯、37°Cの外科用トレー及び直腸温度探針を使用して、中心体温を37±0.5°Cに維持した。左大脚部静脈、左腸骨動脈、右鎖骨動脈及び右頸動脈に、ヘパリン処理した食塩水(400Uヘパリン/mL)が充填されたポリエチレン管(0.58mm内径)を挿入した。大脚部静脈カニューレを使用してトレーサーを注射投与し、右鎖骨動脈カニューレを血圧の監視のための圧力変換器に接続した。左腸骨動脈を、0.055mL/分の一定速度で排出するため予め設けられたハーバードモデル940定速排出ポンプに取り付けられた1mLのシリンジに接続した。右頸動脈中のカニューレの先端を心臓の左心室中に置き、放射線標識されたミクロスフェアの注入に使用した。気管に挿管し、連続的通気を助ける小齧動物用の人工呼吸装置に接続した。

#### 【0015】試験方法

時間0において、<sup>131</sup>I-アルブミン(食塩水0.3mL)

1中)及び<sup>131</sup>Co-EDTA(食塩水0.1mL中~0.1μCi)を静脈内注射し、排出ポンプを同時に始動した。時間0の8分後に、<sup>131</sup>I-BSA 2mLを注射し、1分後に、<sup>131</sup>Sc-ミクロスフェアを~30秒かけてゆっくりと注射した。10分後に、心臓の全血液流を停止させ、排出ポンプを同時に停止し、種々の組織を $\gamma$ 線分光測定のために採取した。腎臓、膀胱及び輸尿管を取り出した。目を上記に説明した方法により(15, 16)切開し、両目から得られた組織を $\gamma$ 線分光測定の前に集めた。全ての組織試料及び動脈血漿試料の重量を計測し、ヒューレットパッカード1000Aコンピューターとインターフェースで接続された $\gamma$ 線分光測定器により計測し、前記コンピューターによりデータがバックグラウンドに対して補正され、次の分析のために保存された。

#### 【0016】データの分析

<sup>131</sup>I-BSA組織活性の量的指標を既に説明した方法(15, 16, 17)で算出し、 $\mu$ g血漿/g組織重量/分として表現した。非常に簡単に、組織中の<sup>131</sup>I-BSA活性に、試験終了時に得られた動脈血漿試料中の<sup>131</sup>I-BSA/<sup>131</sup>I-BSA活性の比率をかけることによって、<sup>131</sup>I-BSA組織活性を、組織中に含まれるトレーサーに関して補正した。血管-補正された<sup>131</sup>I-BSA組織活性を、時間平均化された<sup>131</sup>I-BSA血漿活性(排出シリンジから得られた血漿の十分に混合された試料から得られた)及びトレーサー循環時間(10分間)により割り、次いで組織重量1g当たりに標準化した。腎糸球体の通過速度(GFR)を既に説明した方法(18)により算出した。部位血液流を算出するため、網膜内の<sup>131</sup>Scの全活性を排出シリンジから得られた参照血液試料中の<sup>131</sup>Scの全活性で割り、次いで、ポンプ排出速度でかけ、mL/g組織重量/分として表現した(19)。

#### 【0017】高次グリコシル化最終生成物の調製

リジン-由来の高次グリコシル化生成物を、0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4中において、100mMのグルコース-6-リン酸塩及びL-リジンをインキュベートすることにより、バカララの方法(12)で調製した。このインキュベートは、滅菌状態を維持して行ない、暗所で室温において~6日間維持され、その後に、パーキン-エルマーのLS-5B蛍光光度計を用い、370nmにおける励起及び440nmにおける放射を使用して、グリケーションの指標として相対的蛍光度を測定した。分光光度測定の前に、試料を食塩水で1:1に希釈した。10及び100mM濃度のメチルグアニジン、アミノグアニジンまたはセミカルバジドがグリケーションプロセスを阻害する能力を2つの別個の試験において比較した(図4)。

#### 【0018】血圧測定

テイルーカフ方法(20, 21)を使用して、意識のあ

るラットにおける収縮期の血圧を1週間の間隔をおいて測定した。最初に、動物を拘束装置中に置き、血圧計を数回膨張させることによる方法を採用した。血圧は、浸透性の考察の間に麻酔状態のラットにおける腸骨動脈カニューレからも計測した。

【0019】平均動脈血圧に与えるメチルグアニジンの丸薬注射の影響

250から300g重量の通常の雄のSprague-Dawleyラットを、100mg/体重1kgのイナクチン、次いで0.1ml/体重1kgのd-ツボクラリン塩化物により麻酔し、左大腿部血管（トレーサー注入のため）及び右腸骨動脈（血圧の監視のため）にヘパリン処理された食塩水を充填したポリビニル管（0.8×0.5mm）を挿入し、気管にカニューレを挿入し、連続的通気を助けるために小齧歯動物用の人工呼吸装置に接続した。動脈血圧が安定した後、増加する量（3.1及び50μmoli/kg体重）のメチルグアニジンまたはN<sup>o</sup>-モノメチル-L-アルギニン（NMMA）を、別個の動物において0.5mlの容量で静脈内注射し、ピークの血圧上昇をゴウルドのRS3200記録装置を使用して記録した。結果を基底線上の血圧上昇の百分率として表現した。

【0020】統計的分析

データは平均±1SDとして表現した。分散の分析は、SASの一般線形モデル手順を使用して行なった。多重比較に関連する潜在的なタイプIの誤差を減少するために、各パラメーターに対するグループ間の全体の相違をバントルベルデンテストにより予め評価した。与えられたパラメーターに対するグループ間に、統計的に著しい相違（p < 0.05）が認められた場合は、全てのデータの非母数（階数順）プロン変換の後の最小二乗法により、二重方法の比較を行なった。

【0021】実施例2

本実施例は、Rin-m5F細胞によるIL-1β-誘発された亜硝酸塩生成における、メチルグアニジンの影響を説明するものである（図2）。ワシントン大学組織培養支援センターから入手したRin-m5F細胞を、トリプシン/EDTA処理により生長フラスコ（55～80×10<sup>4</sup>細胞/フラスコ）から取り出し、1mlのペトリ皿中に等分して入れた（1条件当たり1～2×10<sup>4</sup> Rin-m5F細胞）。細胞を、完全CMRL-1066組織培養基（10%胎不活性化された、ウシ胎児血清、2mM L-グルタミン、50ユニット/m1ベニシリン及び50μg/m1ストレプトマイシン）またはメ

チルグアニジン（MG）、アミノグアニジン（AG）若しくはNMMAを補給された完全CMRL-1066の1ml中において、18時間（95%空気及び5%CO<sub>2</sub>の雰囲気下で）インキュベートした。インキュベートの後、上清を除去し、亜硝酸塩を上記した方法（8.13）と同じ検定方法により100μlアリコートにおいて測定した。結果をIL-1誘発された亜硝酸塩生成（%）として表わし、1試験当たり3回の繰り返しを含む4の個々の試験の±SEMの平均値である。結果は、一酸化窒素シンターゼのサイトカイン誘発可能なイソフォームによる一酸化窒素生成の阻害において、AG及びNMMAの両者は、MGよりも～10倍大きいことを示している。

【0022】実施例3

Rin-m5F細胞によるIL-1β-誘発された亜硝酸塩の生成に与えるメチルグアニジン、1,1-ジメチルグアニジン及びアミノグアニジンのそれぞれの影響を、実施例2に記載の方法により試験し、得られた結果を図3に示す。結果は、亜硝酸塩シンターゼのサイトカイン誘発イソフォームの阻害については、AG > DMG > MGの順番で大きいことを示している。

【0023】下記の表1～5及び添付の図面1～4は、上記実施例において得られた結果を記録したものである。これらの結果は、メチルグアニジン及びジメチルグアニジンが、構造性及びサイトカイン誘発されたNO生成の強力なインヒビターであることを示している。このことは、図1に示されるように通常のラットに静脈内注射した場合のメチルグアニジンによる平均動脈血圧の上昇、並びに図2及び3に示されるようにメチルグアニジン及びジメチルグアニジンによる齧歯動物の細胞膜脛細胞における亜硝酸塩のIL-1β-誘発された増加の阻害により証明される。メチルグアニジンは、グルコース誘発されたグリケーション生成を妨げることにおいて

（高次グリケーション最終生成物に特徴的な蛍光性生成物の生成により証明される）、比較的不活性であるので（アミノグアニジンと比較して）（図4）、糖尿病誘発の血管機能不全のメチルグアニジンによる防止は、それがNO生成を阻害する能力に帰するものであると考えられる。従って、メチルグアニジン及びその近接類似物であるジメチルグアニジンは、NOの生成の増加を伴う炎症性及び免疫性疾患の他、糖尿病の合併症の防止に有効である。

【表1】

表 1

体重、血漿グルコース及び水消費に与える  
糖尿病及びメチルグアニジンの影響

	対 照		糖尿病	
	対 照	+mg	糖尿病	+mg
ラット数	10	11	14	18
体 重 (g)				
初 期	249±20	256±16	250±19	248±18
2週間後	326±25	300±31	297±23	271±23
4週間後	375±41	351±37	334±45	294±50
血漿グルコース (mg/dl)	130±15	131±28	419±120	420±87
ヘマトクリット(%)	43±2	42±1	42±1	42±2
血 壓 (mm Hg)				
意識あり	125±18	121±7	123±5	126±5
麻酔状態	118±14	114±14	120±16	121±14
水消費 (ml/日)	46±6	32±9	108±42	93±53

【表 2】

表 2

<sup>125</sup>I-アルブミン浸透<sup>a</sup>に与える糖尿病  
及びメチルグアニジン(mg)の影響

ラット数	対 照		糖尿病	
	対 照	+mg	糖尿病	+mg
10	8	11	9	
前部ブドウ膜	266±77	359±146	623±109	370±60
後部ブドウ膜	328±106	312±101	742±134	358±108
網膜	47±12	61±11	116±30	55±18
座骨神経	47±13	47±10	121±22	50±10
大動脈	62±20	60±18	155±37	85±41
腎臓	727±239	714±214	1011±265	738±169
肺	1805±532	1656±454	1405±324	1498±487
横隔膜	201±75	190±27	210±61	216±46
心臓	521±135	731±269	534±62	599±68
脳	5±3	4±3	5±2	6±4

<sup>a</sup>  $\mu\text{g}$ 血漿/体重1 g/分: 試験手順の詳細は実施例1の方法を参照せよ。

\* 平均±SD

スチューデントのt検定により未処理の対照とは著しく異なる。

: \*p < 0.001; <sup>b</sup>p < 0.05; <sup>c</sup>p < 0.01.

表 3

部位血液流へ与える糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

(n)	前部ブドウ		後部ブドウ		
	膜	膜	網膜	座骨神経	腎臓
対照 (10)	2.0±0.6	3.4±0.6	0.43±0.02	0.06±0.02	6.5±0.3
対照+mg (8)	2.4±0.5	3.3±0.6	0.45±0.07	0.07±0.03	4.8±0.3 *
糖尿病 (10)	2.7±0.3 <sup>b</sup>	4.2±0.5 <sup>b</sup>	0.57±0.08 <sup>a</sup>	0.09±0.01 <sup>a</sup>	6.0±0.4 <sup>c</sup>
糖尿病+mg(9)	2.3±0.6	3.9±0.6	0.45±0.04	0.06±0.02	5.8±0.3 *

\* ml/分/体重1g; 値は放射線標識されたミクロスフェアを使用して測定した  
平均±1SDである。( $\sim 10 \mu\text{m}$  径)

スチューデントのt検定により対照と著しく異なる。: <sup>a</sup>p<0.001;

<sup>b</sup>p<0.005; <sup>c</sup>p<0.01.

【表4】

表 4

GFR\* へ与える糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

	(n)	全腎臓当たり	腎臓1g 当り
対照	(10)	1.33 ± 0.19	0.85 ± 0.07
対照+mg	(8)	1.53 ± 0.29	0.87 ± 0.08
糖尿病	(10)	1.81 ± 0.25 *	0.92 ± 0.14
糖尿病+mg	(9)	1.59 ± 0.15 **	0.85 ± 0.09

\* ml/分；値は放射線標識された<sup>57</sup>Co-EDTAを使用して測定した平均±1SDである。

スチューデントのt検定により対照と著しく異なる。: \*p<0.001;

\*\*p<0.005

スチューデントのt検定により糖尿病と著しく異なる。: \*\*p<0.05.

【表5】

表 5

組織ソルビトールとミオイノシトールへ与える  
糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

	対 照		糖尿病	
	対 照	+mg	糖尿病	+mg
ラット数	7	8	11	9
網 膜				
ソルビトール	102±16*	102±31	983±275	533±265
ミオイノシトール	1613±516	1529±187	1564±452	1513±402
座骨神経				
ソルビトール	183±41	194±75	1999±334	1234±710
ミオイノシトール	3943±526	4263±1587	3444±639	3308±792
赤 血 球				
ソルビトール	6±1	6±2	44±9	40±8
ミオイノシトール	131±47	104±19	109±20	103±19

\* 値は平均±SDである。 ; 試験手順については実施例1の方法を参照せよ。

【0024】本明細書中において説明した一酸化窒素生成のメチルグアニジン及びジメチルグアニジンインヒビターは、借用の方法、好ましくは薬学的に許容され得る希釈剤及び担体との処方物として温血哺乳動物へ投与されるように使用されることができる。投与される活性インヒビターの量は、有効量、即ち、医薬的に効果的であるがその使用に伴う利益よりも重い毒性効果を示さない量でなければならない。人間の大人の一日当たりの投与量は、通常、体重1キロ当り薬品約1mg以上の範囲であると考えられる。投与の適当な経路は、カプセル、錠剤、シロップ、エレキシル及びその類似の形態による経口投与であるが、静脈内、腹膜内または皮下のような非経口投与を使用することもできる。生理食塩水のような水性溶液として本薬物を静脈内投与することを例としてあげることができる。治療投与形態物における薬学的に許容され得る希釈剤及び担体中の本薬物の適当な処方物は、例えば米国ペンシルベニア州イーストンのマックパブリシングカンパニーのアーサーオゾル編集「レミントンズファーマシューティカルサイエンス」16版、(1980)のような本技術分野における一般的テキストを参考にして調製することができる。

【0025】当業者にとって本明細書を読んだ後、本発明の精神と範囲を逸脱することのない種々のその他の実施例が明らかとなるであろう。そのような実施例の全

ては、本明細書中の特許請求の範囲内に包含されることを意図する。

【0026】本明細書中においてカッコ内に引用された参考文献は、下記の通りである。

30 1. D. J. スチュエール、H. J. チョ、N. S. ウォン、M. F. ウアイス、C. F. ナザン、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」、88, 7773 (1991).  
2. S. モンカダ、R. M. J. バルマー、E. A. ヒグス、「Pharmacol. Reviews」、43, 109 (1991).  
3. J. ガースウェイト、「Trends Neurosci.」、14: 60 (1991).  
40 4. J. B. ヒブス、Jr., ら、「Nitric Oxide from L-Arginine: a Bioregulatory System」、S. モンカダ及びE. ヒグス、Eds. エルゼビエール、ニューヨーク、(1990)、pp 189-223.  
5. G. バグリーゼ、R. G. チルトン、J. R. ウィリアムソン、「Diabetes/Metabolism Reviews」、7, 35 (1991).  
6. C. サザン、D. シャルスター、I. C. グリーン、「Febs Lett.」、276, 42 (1990).

7. J. A. コルベット、J. L. ウォン、M. A. スウィートランド、J. R. ランカスター、Jr., M. L. マクダニエル、「Biochemical J.」(submitted).

8. J. A. コルベット、J. R. ランカスター、Jr., M. A. スウィートランド、M. L. マクダニエル、「J. Biol. Chem.」, 266, 2135 1-21354 (1991).

9. J. R. ウィリアムソンら、「Diabetes & Metab.」, 16, 3369 (1990).

T. ソリス-リパロータ、M. クーバー、D. ババゾグロー、B. クラーク、G. ジェラムス、「Diabetes」, 40, 1328 (1991).

10. M. キハラら、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」, 8107 (1991).

11. M. ブラウンリー、A. セラミ、H. ブラッサラ、「N. Engl. J. Med.」, 318, 1315 (1988). M. ブラウンリー、H. ブラッサラ、A. クーニー、P. ウルリッヒ、A. セラミ、「Science」, 232, 1629 (1986).

12. R. ブカラ、K. J. トレーシー、A. セラミ、「J. Clin. Invest.」, 87, 432 (1991).

13. L. C. グリーンら、「Anal. Biochem.」, 126, 131 (1982).

14. O. H. ローリー、J. V. バソノー (1972) 「A Flexible System of Enzymatic Analysis」、オーランド: アカデミックプレス。

15. R. G. チルトン、K. チャン、G. バグリーゼ、D. M. イード、M. A. プロビンス、W. R. シャーマン、C. キロ、J. R. ウィリアムソン、「Diabetes」, 38, 1258-1270 (1989).

16. G. バグリーゼ、R. G. チルトン、A. スピーディー、K. チャン、M. A. プロビンス、C. キロ、J. R. ウィリアムソン、「Metabolism」, 39, 690-697 (1990).

17. G. バグリーゼ、R. G. チルトン、K. チャン、A. スピーディー、M. プロビンス、D. M. イー

ド、P. E. レイシー、C. キロ、J. R. ウィリアムソン、「Diabetes」, 39, 323-332 (1990).

18. Y. Ido, R. G. チルトン、K. チャン、及びJ. R. ウィリアムソン、「Kidney Int.」, In press, 1992.

19. G. バグリーゼ、R. G. チルトン、A. スピーディー、E. サンタレリ、D. M. イード、M. A. プロビンス、C. キロ、W. R. シャーマン、J. R. ウィリアムソン、「Diabetes」, 39, 312-322 (1990).

20. M. J. フレグリー、「J. Lab. Clin. Med.」, 62, 223-230 (1963).

21. J. M. フェファー、M. A. フェファー、E. D. フローリッヒ、「J. Lab. Clin. Med.」, 78, 957-962 (1971).

【0027】政府の援助に対する謝辞

この研究は、米国国立保健研究所の認可DK06181、T32DK07296、EY06600、HL39

20 934及びDK20579により一部援助を受けて行われた。

【図面の簡単な説明】

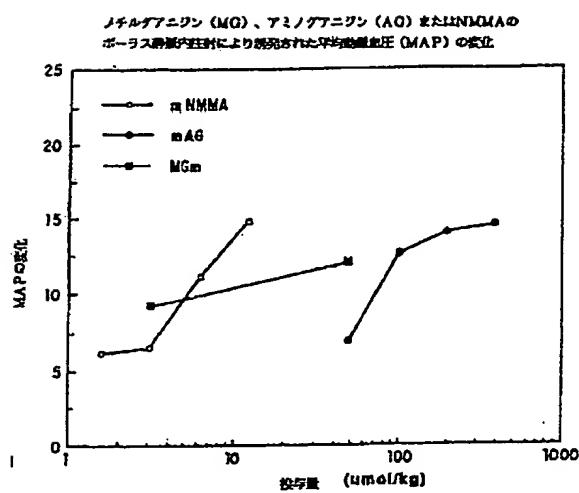
【図1】メチルグアニジン(MG)、アミノグアニジン(AG)またはN<sup>6</sup>-モノメチル-L-アルギニン(NMMA)のポーラス静脈内注射により誘発された平均動脈血圧(MAP)の変化を示すグラフである。

【図2】Rin-m5F細胞によるIL-1 $\beta$ 誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン(MG)、アミノグアニジン(AG)またはN<sup>6</sup>-モノメチル-L-アルギニン(NMMA)の影響を示すグラフである。

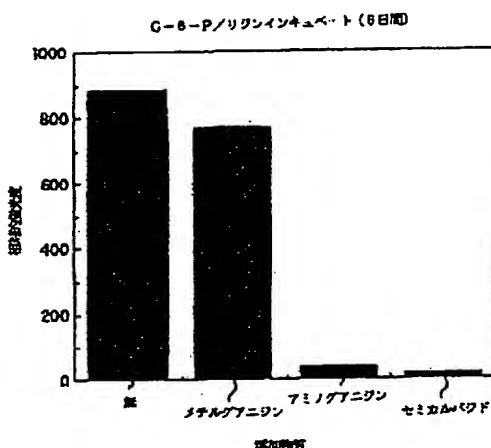
【図3】図2と同様に、Rin-m5F細胞によるIL-1 $\beta$ 誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン(MG)、ジメチルグアニジン(DMG)及びアミノグアニジン(AG)の影響を示すグラフである。

【図4】グルコース-6-ホスフェート/リジン(G-6-P/リジン)中で6日間、メチルグアニジン、アミノグアニジンまたはセミカルバジドをインキュベートした後の、蛍光性生成物の相対的な生成を示す棒グラフである。

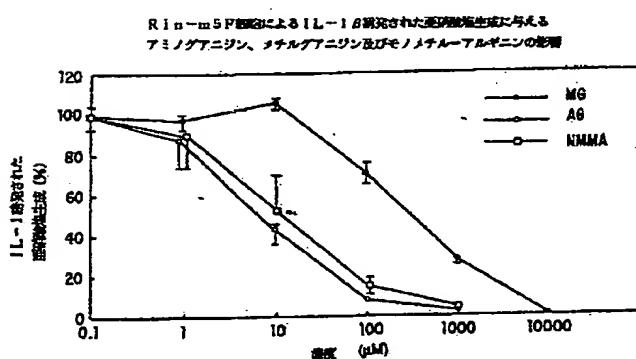
【図 1】



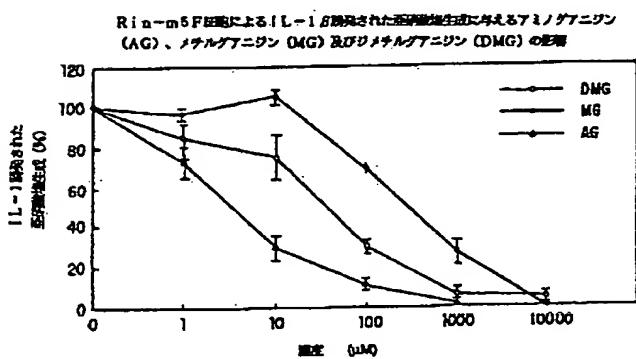
【図 4】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(72)発明者 ジョン エイ コーベット  
アメリカ合衆国ミズーリー州セント ルイス  
. エス コークリッド 660, ワシント  
ン ユニバーシティ スクール オブ メ  
ド, デプト オブ パソロジイ 気付

(72)発明者 マイクル エル. マックダニエル  
アメリカ合衆国ミズーリー州セント ルイス  
. エス. コークリッド 660, ワシント  
ン ユニバーシティ スクール オブ メ  
ド, デプト オブ パソロジイ 気付

(72)発明者 ロナルド ジー. ティルトン  
アメリカ合衆国ミズーリー州セント ルイス  
. エス. コークリッド 660, ワシント  
ン ユニバーシティ スクール オブ メ  
ド, デプト オブ パソロジイ 気付